AVALIAÇÃO DO EFEITO DO DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO NO CICLO DO NITROGÊNIO REALIZADO POR MICRORGANISMOS

Larissa Krochinski Aragão (FA), Daiane Hyeda; Helyemai Althaus (Coautores), Carolina Weigert; Galvão Rafael Mazer Etto (Orientadores), e-mail: carolinawgalvao@hotmail.com; mazeretto@hotmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa/ Química.

Área e subárea: Bioquímica e Bioquímica dos Microrganismos

Palavras-chave: Bactérias promotoras do crescimento vegetal, ecologia microbiana, mineralização.

Resumo
O aumento populacional e a crescente demanda por petróleo e seus derivados levaram a intensificação na exploração, refino e transporte do mesmo, elevando significativamente o risco de desastres ambientais em áreas naturais. Em sua composição química, o petróleo apresenta complexas combinações de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, contêm características hidrofóbicas, e propriedades carcinogênicas, tóxicas, mutagênicas e destrutivas, podendo permanecer no ambiente por períodos prolongados de tempo, causando grandes modificações ambientais, principalmente quando o óleo entra em contato com o solo. Nesse ambiente as contaminações por petróleo reduzem a disponibilidade de nutrientes para plantas e microrganismos. O objetivo do presente estudo foi quantificar, através das metodologias de Número Mais Provável de nitrificadores e amonificadores, o efeito do petróleo nas comunidades microbianas participantes do ciclo do nitrogênio no solo em uma área onde houve derramamento de petróleo. Os resultados comprovam a tolerância e adaptabilidade desses microrganismos ao contaminante, ao mesmo tempo em que os colocam como potenciais biorremediadores.

Introdução

Em 16 de julho de 2000, a ruptura de um oleoduto na Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), Araucária, região metropolitana de Curitiba, Paraná, levou ao vazamento de cerca de quatro milhões de litros de petróleo bruto, atingindo uma pequena porção de Floresta Ombrófila Mista Aluvial, uma parte do leito dos rios Barigui e Iguaçu, e um conjunto de várzeas (banhados) (FUNPAR, 2001; DA SILVA, 2014). Em derramamentos de petróleo, o contaminante rapidamente enche os poros do solo, sendo rapidamente adsorvido por suas partículas, movendo-se verticalmente com o auxílio da gravidade, alterando as composições químicas, físicas e biológicas do solo (MENA *et al.,* 2016). O nitrogênio é um dos macronutrientes mais importantes para a manutenção da vida vegetal. Além de atuar no crescimento, está presente em muitas biomoléculas como, ATP, clorofila, proteínas, enzimas etc (MIFLIN & LEA, 1976; HARPER, 1994). A nitrificação é um processo estritamente microbiológico. A nitrificação ocorre em duas etapas: um grupo de nitrificadores oxida NH_4^+ para NO_2^- (nitrito); outro grupo oxida o NO_2^- para

NO_3^- (nitrato). Assim, para avaliação dos nitrificadores, são preparados dois meios, um para cada grupo (EMBRAPA; 1994).

Após dezenove anos, a cobertura vegetal do Banhado 4, área mais afetada no derramamento de petróleo, encontra-se parcialmente recuperada. Desta forma, o objetivo deste estudo foi averiguar o efeito do derramamento de petróleo sobre as comunidades microbianas atuantes no ciclo do nitrogênio a partir da avaliação da atividade microbiana envolvida na fixação biológica de nitrogênio pelas metodologias de número mais provável de amonificadores e nitrificantes.

Material e Métodos

Foram coletados solos rizosféricos das raízes de *Mimosa oblonga* e *Erythrina crista-galli L* em uma várzea (Banhado 4), na propriedade da Refinaria Presidente Getúlio Vargas (REPAR), em Araucária, região metropolitana de Curitiba – PR. Foram escolhidos aleatoriamente 12 pontos amostrais e organizados em grupos com máxima, média e mínima concentração de hidrocarbonetos. Para o cultivo foram utilizados os meios de cultura para microrganismos amonificadores (Sarathchandra, 1978) e para nitrificadores (Saad & Conrad, 1993). As amostras foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 90 mL de solução salina esterilizada (NaCl 0,85%) e mantidas sob agitação orbital (170 rpm) por 30 minutos à temperatura ambiente. Após a agitação, 0,1mL da solução de solo foram submetidas a uma diluição seriada (10^{-2} a 10^{-6}) em solução salina. Alíquotas de 20 µL de cada diluição foram inoculadas em quadriplicata em placas contendo 180 µL do meio de cultura de amonificadores ou nitrificadores. As análises para a avaliação de ausência ou presença de microrganismos oxidantes de nitrito ocorreu através da mudança de coloração: se o NO_2^- for ausente, é notado como incolor e que há a presença de bactérias oxidantes de NO_2^-. Se apresentar a coloração rósea, significa que há a ausência de oxidantes de NO_2^-. Para a verificação de microrganismos oxidantes de amônio, verifica-se a mudança de coloração para marrom.

Resultados e Discussão

As 12 amostras apresentaram microrganismos amonificadores, sendo o ponto 20 o que apresentou maior NMP de microrganismos amonificadores, enquanto o ponto 27 apresentou o menor valor de NMP dos mesmos. De modo geral, o grupo com maior concentração de hidrocarbonetos, em relação aos demais pontos amostrais, apresentou maior número de microrganismos amonificadores. Tais resultados podem ser explicados pela vasta diversidade de microrganismos capazes de realizar esse processo e a comprovada capacidade dos mesmos em tolerar a diferentes concentrações de petróleo (URAKAWA et al., 2018). Segundo Fageria (1997) e Dias (2016), os microrganismos amonificadores são capazes de incorporar contaminantes que apresentam elevada quantidade de compostos nitrogenados, utilizando os mesmos como fonte de energia e carbono. O petróleo bruto contém cerca de 4% de nitrogênio (ANP, 2017), o que pode explicar os maiores valores de microrganismos amonificadores em alguns pontos com elevadas concentrações de petróleo.

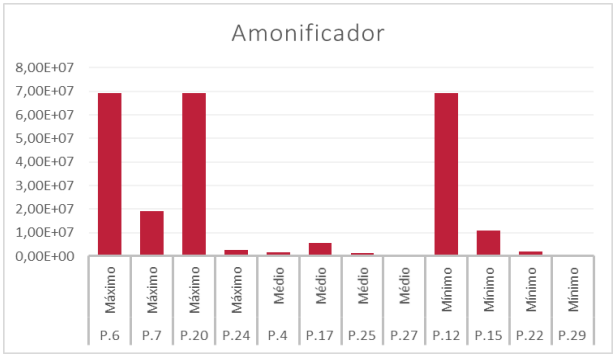


Gráfico 1. Média de amonificadores a partir do NMP, agrupadas pela concentração máxima, média e mínima de hidrocarbonetos do petróleo dos 12 pontos amostrais

Em relação a nitrificação, ambas as metodologias foram testadas. Contudo, a metodologia utilizada para oxidantes de amônio não expressou resultados significativos e não permitiu comprovar ou negar a hipótese de presença ou ausência desses microrganismos. Por esse motivo, a metodologia deve ser revisada e modificada para que em futuros experimentos, os resultados sejam avaliados.

No teste de oxidante de nitrito, os resultados obtidos foram positivos para os 12 pontos amostrais. Contudo, o ponto 20 apresentou maior valor de microrganismos nitrificantes em relação aos demais, enquanto nos pontos 17 e 27 foram observados os menores valores (gráfico 2). Semelhante ao observado para os microrganismos amonificadores, o grupo com maior concentração de hidrocarbonetos apresentou um maior valor de NMP de microrganismos nitrificantes.

Os microrganismos oxidantes de nitrito apresentam sensibilidade a vários derivados de petróleo (FULLER *et al.,* 2004), porém estes não induzem a morte celular e os mesmos têm-se mostrado tolerantes ao petróleo bruto (URAKAWA *et al.,* 2016; URAKAWA *et al.,* 2018). Nos pontos com máxima e mínima concentração de hidrocarbonetos de petróleo, observou-se que há uma grande quantidade de microrganismos oxidantes de nitrito se comparada com os pontos de média concentração de hidrocarbonetos. Denny e Penninckx (2004) observaram que na co-presença de amônio e contaminante, ocorreu uma potencialização de 40% na oxidação de nitrito, mas apenas na presença de hidrocarbonetos, ocorre a redução de oxidação de nitrito. Essa relação é observada também para os microrganismos amonificadores, constatando que o amônio e o contaminante estimulam a proliferação de microrganismos oxidantes de nitrito.

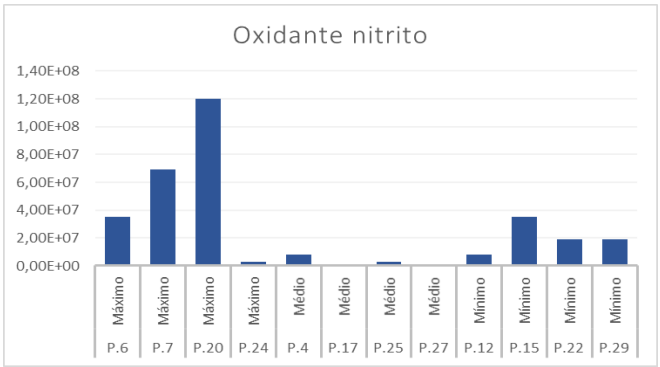


Gráfico 2. Média de oxidantes de nitrito a partir do NMP, agrupadas pela concentração máxima, média e mínima de hidrocarbonetos do petróleo dos 12 pontos amostrais.

Conclusões

Mesmo afetados pelo derramamento de petróleo, os microrganismos amonificadores e nitrificadores demonstraram elevada resiliência e/ou tolerância ao contaminante. A sobrevivência desses microrganismos após o derramamento de petróleo pode ter sido fundamental para recuperação da cobertura vegetal, uma vez que o nitrogênio disponibilizado pelas bactérias é essencial para o desenvolvimento das plantas.

Agradecimentos

Agradeço a UEPG, Capes, Fundação Araucária, PETROBRAS, INCT e ao CNPq pelo apoio financeiro, aos Professores Drº Rafael Mazer Etto e Drª Carolina Galvão por todo apoio e ensinamentos, aos meus colegas do LABMOM (Laboratório de Biologia Molecular Microbiana) por toda ajuda e companheirismo durante a realização do trabalho e às minhas co-orientadoras Daiane Hyeda e Helyemari Althaus por toda paciência e contribuição na carreira científica.

Referências

ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO **Petróleo e Derivados**, 2017. Disponível em: < http://www.anp.gov.br/wwwanp/petroleo-e-derivados2/petroleo> Acesso em 12 maio 2019.

DENI, J.; PENNINCKX, M. J. Influence of long-term diesel fuel pollution on nitrite-oxidising activity and population size of nitrobacter spp. in soil. **Microbiological research**, v. 159, n. 4, p. 323-329, 2004.

DIAS, A. C. Transformações do nitrogênio. In: CARDOSO, N. B. J. E; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. Campinas, Piracicaba: ESALQ Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2ed, p. 99-110, 2016.

FUNDAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA CIÊNCIA, DA TECNOLOGIA E DA CULTURA (FUNPAR). **Diagnóstico e monitoramento da cobertura vegetal da área de influência direta e indireta do vazamento de óleo da Refinaria Presidente Getúlio Vargas – REPAR, Araucária / PR: Fase I – Diagnóstico.** UFPR, Curitiba, 2001. 82 p.

FULLER, C.; BONNER, J.; PAGE, C.; ERNEST, A.; MCDONALD, T.; MCDONALD, S. Comparative toxicity of oil, dispersant, and oil plus dispersant to several marine species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 12, p. 2941-2949, 2004.

HUNGRIA, Mariangela. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAF/8927/1/doc_46.pdf>. Acesso em: 20 maio 2019.

MELO, C. L. **Evolução da contaminação na área do vazamento de óleo cru na Repar (2000): Estudo do sistema "Banhado 4" e aplicação do método de polarização induzida na investigação da biodegradação de hidrocarbonetos.** 315 f. Tese (Doutorado em Geociências), Instituto de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MENA, E.; VILLASEÑOR, J.; RODRIGO, M. A.; CAÑIZARES, P. Electrokinetic remediation of soil polluted with insoluble organics using biological permeable reactive barriers: Effect of periodic polarity reversal and voltage gradient. **Chemical Engineering Journal**, v. 299, p. 30-36, 2016.